

· 论 著 ·

HER-3 基因表达对乳腺癌细胞放射抵抗及 Apelin/APJ 信号通路的作用机制

李馨如, 罗成, 荀欣, 贾舒婷

解放军联勤保障部队第九二〇医院肿瘤科, 云南 昆明 650000

摘要: **目的** 探讨人表皮生长因子受体(HER)-3 基因表达在乳腺癌细胞放射抵抗及 Apelin/G 蛋白偶联受体(APJ)信号通路中的作用。**方法** 将乳腺癌细胞株处理后分为乳腺癌组(生长状态良好的 MCF-7 细胞)、空白组(MCF-7 细胞+阴性对照慢病毒)、HER-3 组(MCF-7 细胞+HER-3 敲低)、F13A 组[MCF-7 细胞+10 pm/ml APJ拮抗剂 Apelin13(F13A)]、联合组(MCF-7 细胞+10 pm/ml F13A+HER-3 敲低)。采用 qRT-PCR、CCK-8、流式细胞仪检测各组细胞 HER-3 mRNA 的表达、细胞活力及凋亡率;给予 0、2、4、6、8 Gy 放射剂量照射观察各组细胞放射敏感性;各组细胞 Apelin13、APJ、血管内皮生长因子(VEGF)及低氧诱导因子(HIF)-1 α 蛋白的表达采用免疫印迹法检测,其与 HER-3 的相关性采用 Pearson 法分析。**结果** 乳腺癌组、空白组、HER-3 组、F13A 组及联合组的 HER-3 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.96 ± 0.03 、 0.58 ± 0.05 、 0.62 ± 0.06 及 0.23 ± 0.04 ($F=346.100$, $P<0.01$);与乳腺癌组及空白组相比,HER-3 组、F13A 组及联合组 24、48、72 及 96 h 时 MCF-7 细胞活力均降低 ($P<0.05$);各组 MCF-7 细胞凋亡率差异有统计学意义 ($F=125.200$, $P<0.05$),联合组细胞凋亡率最高 ($P<0.05$);照射剂量为 2、4、6、8 Gy 时 HER-3 组、F13A 组及联合组细胞活性均低于乳腺癌组及空白组 ($P<0.05$);与乳腺癌组及空白组比较,HER-3 组、F13A 组及联合组 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 蛋白表达均降低 ($P<0.05$);HER-3 分别与 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 呈现正相关性 ($P<0.05$)。**结论** 敲低 HER-3 基因可以抑制乳腺癌细胞活性,加快凋亡,并可一定程度上增加乳腺癌放疗敏感性,其机制可能与抑制 Apelin/APJ 信号通路活性相关。

关键词: 乳腺癌;人表皮生长因子受体-3;放射抵抗;G 蛋白偶联受体

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2023)01-0012-06

HER-3 gene expression on radioresistance and Apelin/APJ signaling pathway of breast cancer cells

LI Xin-ru, LUO Cheng, XUN Xin, JIA Shu-ting

Department of Oncology, The 920th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Kunming, Yunnan 650000, China

Corresponding author: JIA Shu-ting, E-mail: 1014929484@qq.com

Abstract: Objective To investigate the mechanism of human epidermal growth factor receptor-3 (HER-3) gene expression on radioresistance and Apelin (APJ-endogenous ligand apelin) /APJ (G protein-coupled receptor) signaling pathway in breast cancer cells. **Methods** Breast cancer cells were divided into breast cancer group (MCF-7 cells in good state), blank group (MCF-7 cells + negative control lentivirus), HER-3 group (MCF-7 cells+knockdown of HER-3), F13A group [MCF-7 cells +10 pm/ml F13A (APJ-specific antagonist)] and combined group (MCF-7 cells +10 pm/ml F13A + knockdown of HER-3). The expressions of HER-3 mRNA, cell viability and apoptosis rate were respectively detected by qRT-PCR, CCK-8 and flow cytometry. Radiosensitivity was observed by 0, 2, 4, 6 and 8 Gy radiation doses in each group. The protein expressions of Apelin13, APJ, VEGF and HIF-1 α were detected by western blot, and Pearson method was used to analyze the correlation between them and HER-3. **Results** The mRNA expressions of HER-3 in breast cancer group, blank group, HER-3 group, F13A group and combined group were $1.00\pm$

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2023.01.003

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81762062)

通信作者: 贾舒婷, E-mail: 1014929484@qq.com

出版日期: 2023-01-20

0.00, 0.96 ± 0.03 , 0.58 ± 0.05 , 0.62 ± 0.06 and 0.23 ± 0.04 , respectively ($F = 346.100$, $P < 0.01$). Compared with those in breast cancer group and blank group, the activity of MCF-7 cell line in HER-3 group, F13A group and combined group statistically decreased at 24-, 48-, 72- and 96-h ($P < 0.05$). There was a significant difference in apoptosis rate of MCF-7 cell lines among five groups ($F = 125.200$, $P < 0.05$), and the apoptosis rate was the highest in combined group than those of other groups ($P < 0.05$). When the irradiation dose was 2-, 4-, 6- and 8-Gy, the cell activity in HER-3 group, F13A group and combined group were significantly lower than that in breast cancer group and blank group ($P < 0.05$). Compared with breast cancer group and blank group, the protein expressions of Apelin13, APJ, VEGF and HIF-1 α in HER-3 group, F13A group and combined group decreased significantly ($P < 0.05$). HER-3 was positively correlated with Apelin13, APJ, VEGF and HIF-1 α ($P < 0.05$), respectively. **Conclusion** Knockdown HER-3 gene can inhibit the activity of breast cancer cells, accelerate apoptosis, and increase the sensitivity of breast cancer radiotherapy to a certain extent. The mechanism may be related to the inhibition of the activity of Apelin/APJ signaling pathway.

Keywords: Breast cancer; Human epidermal growth factor receptor-3; Radioresistance; G protein coupled receptor

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81762062)

乳腺癌是临床常见的恶性肿瘤疾病,随着生活压力增大,其发病率逐渐升高,对人类健康造成极大威胁。但是近些年随着对乳腺癌的深入研究,患者生存率有所提高,但是术后再次复发、化疗耐药及放射抵抗仍是导致患者预后不佳的主要原因^[1]。放疗是乳腺癌患者术后主要辅助治疗方法,可通过降低乳腺癌细胞活性、促使凋亡,进而减少淋巴结转移,降低病死率。但是部分患者在放疗过程中出现的内源性放射抵抗或获得性抵抗影响临床效果,是目前乳腺癌治疗过程中需要面临的障碍及挑战^[2]。1993年 O'Down 学者通过同源克隆技术发现了一种新的 G 蛋白偶联受体,命名为 APJ;1998年从牛分泌物中进一步提取出 APJ 相关的内源性配体 (APJ endogenous ligand),命名为 Apelin^[3]。随着对 Apelin/APJ 研究的深入,发现其水平与肿瘤发生发展密切相关,并已经在多个恶性肿瘤中存在异常表达,例如结肠癌、肺癌、口腔癌及乳腺癌等。在乳腺癌组织及细胞中 Apelin/APJ 表达升高,具有促进肿瘤血管生长、增加肿瘤体积的作用,但是当阻断 Apelin/APJ 信号传导时肿瘤生长明显受到抑制,证实 Apelin/APJ 与乳腺癌的相关性^[4]。

现有的研究表明,乳腺癌的治疗效果及预后与其分子表型存在紧密的关联,人表皮生长因子受体 (human epidermal growth factor receptor, HER)-3 是表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 家族成员之一,有 30% 的乳腺癌患者存在 HER-3 过表达,可以通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 表达进而加快肿瘤生长活性而提高放疗抵抗^[5]。本研究观察 HER-3 在乳腺癌中的表达,探讨其对乳腺癌细胞放疗抵抗及 Apelin/APJ 水平的影响,以为乳腺癌分子机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养 正常人乳腺上皮细胞株 MCF-10A、人乳腺癌细胞株 AU-565、SKBR-3、BICRH1、MDA-MB-231、MCF-7 均购自上海生物研究所。细胞培养:细胞置于显微镜观察有无污染,放入 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下培养,24 h 后弃去培养基后加入含有 1% 双抗的 10% 的胎牛血清中培养,培养条件同上。显微镜下观察细胞生长至 80% ~ 90% 时进行传代,75% 乙醇消毒,弃去旧的培养基, PBS 洗涤三次,加入 0.25% 胰蛋白酶消化,生长至 90% 时终止消化反应,脱壁后,放入 15 ml 的离心管中离心 5 min 后,弃去上清液放入培养基中 2~3 d 传代。

1.2 主要试剂与仪器 APJ 拮抗剂 Apelin13 (F13A) 购自美国 Sigma; HER-3 的慢病毒载体由上海吉玛制药技术合成; RPMI 1640 培养基购自武汉益普生物科技;胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶均购自中国上海素尔生物科技;山羊抗小鼠 IgG 购自中国武汉纯度生物科技;兔抗人 Apelin 单克隆抗体购自深圳市豪地华拓生物科技;兔抗人 APJ 单克隆抗体购自爱必信(上海)生物科技;兔抗人 VEGF 多克隆抗体购自北京义翘神州科技;实时荧光定量 PCR 仪购自广州达安基因股份有限公司;酶标仪 (Elx800) 购自美国 Bio-Tek 公司;TDZ4-WS 低速台式离心机购自中国湖南湘瑞生物科技;凝胶成像系统及 Western blot 电泳系统均购自中国北京赛百奥科技。

1.3 qRT-PCR 检测正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 及人乳腺癌细胞中 HER-3 的 mRNA 表达 利用 Trizol 法提取两类细胞总 RNA,无核酸酶溶解。将提取的 RNA 进行逆转录为 cDNA,获得反体系,条件为:42 °C 作用 60 min,72 °C 作用 5 min,4 °C 终点。采用

qRT-PCR 检测,每个细胞设置 6 个复孔,上下游引物均为 0.5 μ l,以 GAPDH 为内参,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预作用 3 min,95 $^{\circ}$ C 作用 5 s,58 $^{\circ}$ C 退火,40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算各细胞中 HER-3 相对表达量。引物序列:HER-3 上游为 5'-AGT GAG GCC AAG ACT CCA AT-3',下游为 5'-ACT CCC AAA CTG TCA CAC CA-3'; GAPDH 上游为 5'-GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC-3',下游为 5'-GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTC -3'。

1.4 慢病毒转染及分组 取生长状态良好的 MCF-7 细胞按照 3×10^5 个/皿的密度接种于培养皿中,生长融合至 60% 时采用 5 μ g/ml 的聚凝胺替换培养 10 h 后,按照说明书加入等比例的 HER-3 敲低(慢病毒感染干扰)及阴性对照慢病毒培养液,HER-3 慢病毒感染干扰序列:5'-GGA CUC GAG CAA CAU UGA UTT-3',阴性对照慢病毒序列:5'-UUC UCC GAA AAU GUG ACA CGU TT-3',二者均由上海吉玛制药技术设计并合成。8 h 后观察细胞状态。发现细胞状态较差时去除含有慢病毒的上清液,加入培养液含浓度为 1 mg/ml 嘌呤霉素进行筛选,1 周通过 PCR 方法验证转染效率。分组:乳腺癌组(生长状态良好的 MCF-7 细胞)、空白组(MCF-7 细胞+阴性对照慢病毒)、HER-3 组(MCF-7 细胞+HER-3 敲低)、F13A 组(MCF-7 细胞+10 pm/ml F13A)、联合组(MCF-7 细胞+10 pm/ml F13A+HER-3 敲低)。

1.5 CCK-8 检测各组细胞活力 6 孔板中每孔均加入 150 μ l 的 MCF-7 细胞悬液,数目 5×10^3 个/L,每组设置 6 孔,加入 CCK-8 试剂(5 g/L),每孔 20 μ l,遮光条件下加入 200 μ l 的 DMSO 溶液,轻微摇晃 15 min 后促使充分溶解后,在 24、48、72 及 96 h 时在波长 490 nm 检测吸光度(OD 值)。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 0.25% 蛋白酶消化的 MCF-7 细胞,接种到无牛血清培养基过夜,24 h 后收集细胞,每组选择 3 个样本,PBS 洗涤 1 次,100 μ l 接种于 5 ml 流式试管中,5 μ l 的 IFITC Annexin V 与 5 μ l PI 混合后染色,无光条件下,孵育 15 min 后注入 400 μ l 结合缓冲液混匀,予以洗涤,次数 3 次,后采用流式细胞仪分析细胞凋亡程度。

1.7 放射敏感性 采用 Varian 2100 C 直线加速器 6MV X 线为放射源,源皮距照射,剂量率 400 cGy/min,SSD = 100 cm, PDD = 80%,照射野 100 mm \times 100 mm,按 0、2、4、6、8 Gy 的剂量组给予照射用于描绘剂量存活曲线。对 3 次照射的存活分数的平均数进行分析。运用 GraphPad Prism 8.0 软件进行单击多靶模型曲线拟合。

1.8 免疫印迹法检测 MCF-7 细胞 Apelin13、APJ、血管内皮生长因子(VEGF)及缺氧诱导因子(HIF)-1 α 蛋白水平 MCF-7 细胞移入 6 孔板中,细胞浓度为 2.5×10^4 个/ml, PBS 冲洗,加入 150 μ l RIPA 的裂解液,离心 15 min 后,放入样孔中,进行电泳实验。PVDF 膜 TBS 浸泡 10 min,反复 PBS 冲洗,5 min/次,加入 Apelin13(1 : 500)、APJ(1 : 500)、VEGF(1 : 1 000) 及 HIF-1 α (1 : 500) 一抗和内参 GAPDH 抗体(1 : 1 000),TBS 冲洗 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(1 : 5 000),杂交冲洗。后将膜浸入 ECL 工作液,随后进行检测,获取图像。

1.9 统计学方法 数据采用 GraphPad Prism 8 软件进行分析。数据均符合正态分布,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用方差分析,Bonferroni 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常乳腺上皮细胞及人乳腺癌细胞中 HER-3 mRNA 比较 与正常人乳腺上皮细胞株 MCF-10A 相比,人乳腺癌细胞株 AU-565、SKBR-3、BICRH1、MDA-MB-231、MCF-7 细胞中 HER-3 mRNA 表达升高($P < 0.05$);与其他乳腺癌细胞相比,MCF-7 细胞株 HER-3 mRNA 表达升高($P < 0.05$)。见图 1A。

2.2 各组 MCF-7 细胞株 HER-3 mRNA 表达 乳腺癌组、空白组、HER-3 组、F13A 组及联合组的 HER-3 mRNA 相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.96 ± 0.03 、 0.58 ± 0.05 、 0.62 ± 0.06 及 0.23 ± 0.04 ,组间差异有统计学意义($F = 346.100$, $P < 0.01$)。乳腺癌组与空白组比较,HER-3 组与 F13A 组比较,HER-3 mRNA 表达差异均无统计学意义($P > 0.05$);与空白组比较,HER-3 组、F13A 组及联合组 HER-3 mRNA 表达均降低($P < 0.05$);联合组较 F13A 组更低($P < 0.05$)。见图 1B。

2.3 CCK-8 检测各组 MCF-7 细胞株活力比较 乳腺癌组与空白组比较,HER-3 组与 F13A 组比较,在 24、48、72 及 96 h 时 MCF-7 细胞株活力差异均无统计学意义($P > 0.05$);与空白组相比,HER-3 组、F13A 组及联合组 24、48、72 及 96 h 时 MCF-7 细胞株活力均降低($P < 0.05$);与 F13A 组相比,联合组上述细胞活力均降低($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 流式细胞仪检测各组 MCF-7 细胞株凋亡率 各组 MCF-7 细胞株凋亡率比较差异有统计学意义($F = 125.200$, $P < 0.05$);乳腺癌组与空白组比较,HER-3 组与 F13A 组比较,凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$);与空白组比较,HER-3 组、F13A 组及联合组凋

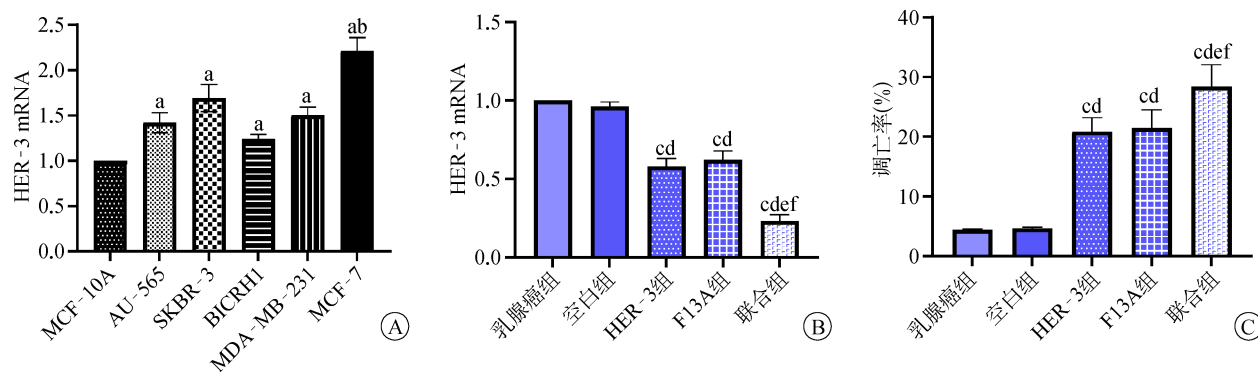
亡率均升高;与 F13A 组相比,联合组凋亡率更高($P < 0.05$)。见图 1C。

2.5 各组 MCF-7 细胞放疗敏感性比较 各组 MCF-7 细胞在 0 Gy 时细胞活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。在放疗照射剂量为 2、4、6、8 Gy 时,乳腺癌组与空白组比较、HER-3 组与 F13A 组比较细胞活性差异均无统计学意义($P > 0.05$),HER-3 组、F13A 组及联合组细胞活性均低于空白组($P < 0.05$),联合组活性低于 F13A 组($P < 0.05$)。见表 2。

2.6 各组 MCF-7 细胞 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 蛋白水平比较 乳腺癌组、空白组 MCF-7 细胞

Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 蛋白水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$);与乳腺癌组、空白组相比,HER-3 组、F13A 组及联合组 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 蛋白水平均降低($P < 0.05$);HER-3 组与 F13A 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);与 F13A 组比较,联合组 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 蛋白水平均降低($P < 0.05$)。见表 3、图 2。

2.7 乳腺癌细胞中 HER-3 与 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 相关性分析 Pearson 分析结果示,HER-3 与 Apelin13、APJ、VEGF、HIF-1 α 分别呈正相关关系($r = 0.415、0.364、0.541、0.511, P < 0.05$)。见图 3。



注:A为正常乳腺上皮细胞与各种乳腺癌细胞中 HER-3 mRNA 表达比较(与 MCF-10A 相比,^a $P < 0.05$;与其他乳腺癌细胞相比,^b $P < 0.05$); B为各组 MCF-7 细胞株中 HER-3 mRNA 表达比较;C为各组 MCF-7 细胞株凋亡率比较(与乳腺癌组相比,^c $P < 0.05$;与空白组相比,^d $P < 0.05$;与 HER-3 组相比,^e $P < 0.05$;与 F13A 组相比,^f $P < 0.05$)。

图 1 不同细胞中 HER-3 mRNA 表达和凋亡率比较

Fig. 1 Comparison of HER-3 mRNA expressions and apoptosis rates in different cells

表 1 各组 MCF-7 细胞株活力比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of MCF-7 cell line activity in each group ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
乳腺癌组	0.355±0.021	0.545±0.023	0.733±0.035	1.210±0.051
空白组	0.350±0.016	0.539±0.027	0.721±0.043	1.185±0.048
HER-3 组	0.250±0.047 ^{ab}	0.405±0.028 ^{ab}	0.606±0.030 ^{ab}	0.843±0.035 ^{ab}
F13A 组	0.243±0.043 ^{ab}	0.396±0.031 ^{ab}	0.593±0.027 ^{ab}	0.836±0.040 ^{ab}
联合组	0.106±0.019 ^{abcd}	0.189±0.020 ^{abcd}	0.355±0.027 ^{abcd}	0.450±0.032 ^{abcd}
F 值	60.440	184.700	127.600	331.600
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与乳腺癌组相比,^a $P < 0.05$;与空白组相比,^b $P < 0.05$;与 HER-3 组相比,^c $P < 0.05$;与 F13A 组相比,^d $P < 0.05$ 。

表 2 各组 MCF-7 细胞放疗敏感性比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of radiotherapy sensitivity of MCF-7 cells in each group ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

照射剂量	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
乳腺癌组	1.00±0.00	0.614±0.045	0.541±0.034	0.361±0.022	0.181±0.017
空白组	1.00±0.00	0.588±0.050	0.533±0.038	0.355±0.025	0.179±0.020
HER-3 组	1.00±0.00	0.401±0.029 ^{ab}	0.359±0.020 ^{ab}	0.226±0.033 ^{ab}	0.086±0.015 ^{ab}
F13A 组	1.00±0.00	0.405±0.027 ^{ab}	0.360±0.022 ^{ab}	0.215±0.025 ^{ab}	0.082±0.017 ^{ab}
联合组	1.00±0.00	0.220±0.015 ^{abcd}	0.218±0.017 ^{abcd}	0.124±0.016 ^{abcd}	0.045±0.005 ^{abcd}
F 值		122.400	147.000	99.460	93.330
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与乳腺癌组相比,^a $P < 0.05$;与空白组相比,^b $P < 0.05$;与 HER-3 组相比,^c $P < 0.05$;与 F13A 组相比,^d $P < 0.05$ 。

表 3 各组 MCF-7 细胞 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 蛋白水平比较 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Comparison of protein levels of Apelin13, APJ, VEGF and HIF-1 α in MCF-7 cells in each group (n=6, $\bar{x}\pm s$)

组别	Apelin13	APJ	VEGF	HIF-1 α
乳腺癌组	0.58 \pm 0.08	1.01 \pm 0.12	1.84 \pm 0.21	1.25 \pm 0.18
空白组	0.55 \pm 0.10	0.96 \pm 0.14	1.80 \pm 0.22	1.22 \pm 0.20
HER-3 组	0.34 \pm 0.06 ^{ab}	0.54 \pm 0.07 ^{ab}	1.22 \pm 0.15 ^{ab}	0.92 \pm 0.15 ^{ab}
F13A 组	0.33 \pm 0.04 ^{ab}	0.51 \pm 0.10 ^{ab}	1.18 \pm 0.19 ^{ab}	0.93 \pm 0.12 ^{ab}
联合组	0.14 \pm 0.03 ^{abcd}	0.30 \pm 0.08 ^{abcd}	0.84 \pm 0.10 ^{abcd}	0.66 \pm 0.09 ^{abcd}
F 值	43.430	51.390	34.690	15.190
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与乳腺癌组相比,^aP<0.05;与空白组相比,^bP<0.05;与 HER-3 组相比,^cP<0.05;与 F13A 组相比,^dP<0.05。

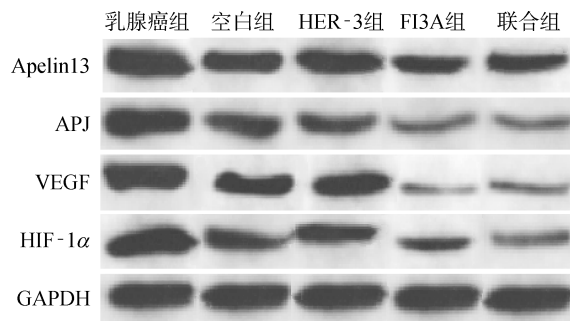


图 2 各组 MCF-7 细胞 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 蛋白表达情况

Fig. 2 Expression of protein of Apelin13, APJ, VEGF and HIF-1 α in MCF-7 cells in each group

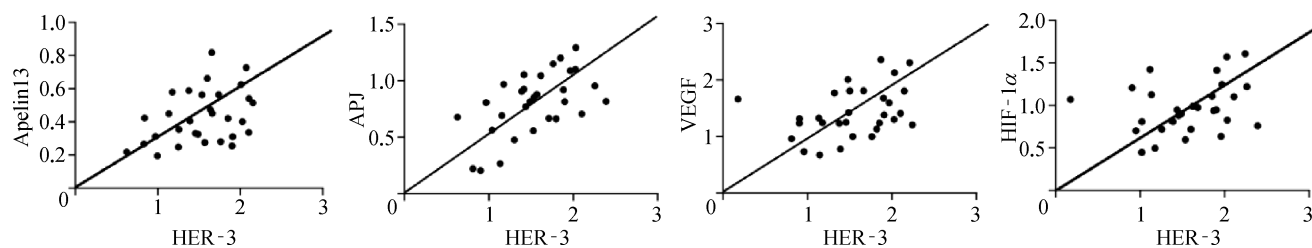


图 3 HER-3 分别与 Apelin13、APJ、VEGF、HIF-1 α 的相关性

Fig. 3 Correlations between HER-3 and Apelin13, APJ, VEGF and HIF-1 α

3 讨论

乳腺癌发生是多因素、多环节及基因改变相关作用导致的结果,其中基因改变既包含抑癌因子失活还包含致癌因子突变。国内外已有学者报道 HER-3 与胃癌及肺癌的发生密切相关,并随着对其研究深入,认为 HER-3 在乳腺癌中也升高。本研究在体外培养的乳腺癌细胞中观察敲低 HER-3 后对细胞活性、放疗抵抗及 Apelin13、APJ 水平的影响,以期乳腺癌的治疗提供实验参考。

EGFR 在多种恶性肿瘤中表达升高,作为 EGFR 家族成员之一,HER-3 是主要位于人体 12 号染色体上的分子量为 160 \times 10³ 的跨膜蛋白^[6],其在机体组织中表达广泛,在正常组织细胞中低表达,且具有促进细胞分化增殖的作用。耿介^[7]的研究表明,卵巢癌细胞中 HER-3 存在过表达,并随着分化程度降低其表达升高。HER2 阳性乳腺癌患者发病率约为 20%~30%,具有侵袭及转移性较强和预后差的特点。HER-3 可以与 HER2 结合成 HER2/HER3 异二聚体,通过对下游信号激活加快乳腺癌细胞增殖分化^[8]。HER-3 在乳腺癌细胞中过表达,并可调节下游区域的亚基 p85 与 PI3K 结合,加快 PI3K 活性可加快癌细胞存活和有丝分裂^[9]。本研究表明,乳腺癌细胞中 HER-3 表达升高,敲低后可降低乳腺癌细胞

存活,加快凋亡,其机制可能为破坏 HER-3 与下游信号 PI3K 的结合而降低细胞信号传导进而抑制信号通路活性。

放疗是乳腺癌综合治疗的重要环节^[10],但是多数研究显示,乳腺癌患者放疗后仍会发生转移,认为提高放疗敏感性对抑制乳腺癌疾病进展十分重要^[11]。在食管癌细胞研究中证实,放疗时产生的 ROS 激活 HER-3 信号通路,使癌细胞发生放疗抵抗,敲低 HER-3 能够增强食管鳞癌的放疗敏感性^[12]。本研究表明,照射剂量为 2、4、6、8 Gy 时,HER-3 组、F13A 组及联合组细胞活性均低于乳腺癌组及空白组,说明敲低 HER-3 后可增加乳腺癌细胞的辐射敏感性。组蛋白 H2AX 的 γ 磷酸化形态 (γ H2AX) 是 DNA 断裂的标志^[13],敲低 HER3 后的乳腺癌细胞经辐射后可增加细胞核内 γ H2AX 焦点数目,并随着辐射剂量增加而增加,因此可以推测敲低 HER3 可增加放疗对乳腺癌 DNA 损伤,降低癌细胞 DNA 修复而加快凋亡^[14]。

本研究发现,与乳腺癌组及空白组比较,HER-3 组、F13A 组及联合组 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 表达均降低,HER-3 分别与 Apelin13、APJ、VEGF 及 HIF-1 α 存在正相关性,说明敲低 HER-3 表达可能抑制乳腺癌细胞血管生成、增加凋亡。Apelin/APJ 是与血管生成相关的因子,肿瘤细胞 Apelin/APJ 表达

增加,可通过加快肿瘤发育而激活新的血管生成^[15]。卢文峰^[16]研究显示,益气养精方能拮抗 Apelin13 对肺腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力的作用,其机制可能是通过 Apelin13 对血管生成相关因子 VEGF、HIF-1 α 、PI3K 等进行下调而发挥作用,提示对 Apelin/APJ 进行阻断可以抑制肿瘤的血管新生,具有治疗肿瘤的意义。以上说明,HER-3 过表达可以通过调控 PI3K/Akt 信号而促进乳腺癌发生发展,同时 PI3K/Akt 可以激活 VEGF 间接上调 Apelin/APJ 表达,因此推测敲低 HER-3 可能通过降低 PI3K/Akt 活性而减缓乳腺癌细胞血管生长,降低 Apelin/APJ 活性发挥改善疾病的作用。

综上所述,敲低 HER-3 基因可以抑制乳腺癌细胞活性,促进其凋亡,并可一定程度上增加乳腺癌放疗敏感性,其机制可能与抑制 Apelin/APJ 信号通路活性相关。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Choi J, Yoon YN, Kim N, et al. Predicting radiation resistance in breast cancer with expression status of phosphorylated S6K1[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 641.
- [2] Sencan S, Tanriover M, Ulasli M, et al. UV radiation resistance-associated gene (UVRAG) promotes cell proliferation, migration, invasion by regulating cyclin-dependent kinases (CDK) and integrin- β /Src signaling in breast cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(5): 2075-2084.
- [3] Cabiati M, Gaggini M, de Simone P, et al. Evaluation of Apelin/APJ system expression in hepatocellular carcinoma as a function of clinical severity[J]. Clin Exp Med, 2021, 21(2): 269-275.
- [4] 胡丹,朱伟峰,沈武成,等. Apelin 和 Snail 蛋白在乳腺癌中的表达及其预后意义[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(10): 743-746.
Hu D, Zhu WF, Shen WC, et al. Expression of Apelin and Snail protein in breast cancer and their prognostic significance[J]. Chin J Pathol, 2018, 47(10): 743-746.
- [5] 卢倩. HER3 与 DJ-1 共偶联在乳腺癌细胞中的作用及对放疗敏感性机制探讨[D]. 南京: 南京医科大学, 2017.
Lu Q. Novel association of DJ-1 with HER3 potentiates HER3 activation and signaling in breast cancer[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2017.
- [6] Nazari M, Zamani Koukhaloo S, Mousavi S, et al. Development of a ZHER3-affibody-targeted nano-vector for gene delivery to HER3-overexpressed breast cancer cells[J]. Macromol Biosci, 2019, 19(11): e1900159.
- [7] 耿介. 酪氨酸激酶 3 对赫赛汀耐药的卵巢癌细胞株 SKOV3/H 增殖和成瘤能力的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(15): 22-28.
Geng J. Effect of HER-3 on proliferation and tumorigenicity abilities of Herceptin-resistant ovarian cancer cell line SKOV3/H[J]. Chin J Mod Med, 2017, 27(15): 22-28.
- [8] 杨柳婷. NRG1/HER3 通路激活致 HER2 阳性乳腺癌曲妥珠单抗原发耐药作用机制的研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2018.
Yang LT. The mechanism study of the NRG1/HER3 activation in the primary resistance of HER2-positive breast cancer to trastuzumab[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2018.
- [9] Chakrabarty A, Sánchez V, Kuba MG, et al. Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(8): 2718-2723.
- [10] 杨霞, 汤山松, 谢仲梅, 等. miR-216a-5p 靶向 TRIP4 对乳腺癌细胞放射敏感性的影响及机制研究[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(1): 61-68.
Yang X, Tang SS, Xie ZM, et al. Effect of miR-216a-5p targeting TRIP 4 on radiosensitivity of breast cancer cells and its mechanism[J]. J Guangxi Med Univ, 2021, 38(1): 61-68.
- [11] 罗婉蓉, 余佳, 刘冲, 等. 53BP1 缺失补偿 DNA 同源重组修复增强 BCCIP 阴性乳腺癌细胞放疗抗性[J]. 激光生物学报, 2021, 30(3): 207-216.
Luo WR, Yu J, Liu C, et al. 53BP1 depletion enhances radiotherapy resistance by compensating DNA homologous recombination repair capacity in BCCIP deficient breast cancer cells[J]. Acta Laser Biol Sin, 2021, 30(3): 207-216.
- [12] 严菁菁. ROS 调节的 HER3 激活降低食管鳞癌放射敏感性[D]. 南京: 南京医科大学, 2018.
Yan JJ. HER3 activation mediated by ROS increases radioresistance of esophageal squamous cell carcinoma[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2018.
- [13] Ji J, Zhang Y, Redon CE, et al. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171582.
- [14] 聂忱, 王远东, 王燕, 等. HER-3 基因表达对 HER-2 阳性型乳腺癌细胞放射敏感性的影响及作用机制[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(21): 3714-3716.
Nie C, Wang YD, Wang Y, et al. The influence and mechanism of HER-3 gene expression on radiosensitivity of HER-2 positive breast cancer cells[J]. J Mod Oncol, 2021, 29(21): 3714-3716.
- [15] 彭雪微. Apelin-13 促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及转移机制研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2015.
Peng XW. The mechanism of apelin-13 promoting breast cancer MCF-7 cells proliferation and invasion[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2015.
- [16] 卢文峰. 从 apelin/APJ 系统探索益气养精方对肺癌血管生成及侵袭转移的影响[D]. 上海: 上海交通大学, 2018.
Lu WF. The influence of Enhance Qi Nourish Jing Formula on angiogenesis, invasion and metastasis of lung cancer from apelin/APJ system[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018.

收稿日期: 2022-04-05 修回日期: 2022-05-23 编辑: 石嘉莹